

## Резистентность к родентицидам-антикоагулянтам. Новая молекулярная методология определения мутаций гена резистентности VKORC1 и понимание их возможного влияния на эффективность применения препаратов

С. В. Прескотт, г.н.с., руководитель отдела позвоночных-вредителей факультета биологических наук, Университет Рединга, Уайтнайтс, Рединг, Беркшир RG6 6AS, Британия, e-mail: c.v.prescott@reading.ac.uk

Уже более полувека мы используем родентициды-антикоагулянты, которые сейчас известны как эффективные и безопасные средства контроля численности грызунов. Однако открытая в 1958 году резистентность к антикоагулянтам создает серьезные проблемы для их дальнейшего применения. Выявление разных типов резистентности популяций вредителей к антикоагулянтам – очень важное направление в разработке стратегий борьбы. Лабораторные тесты показывают не только наличие резистентности, но и степень ее проявления.

Первые лабораторные исследования были направлены на определение времени поедания приманки с антикоагулянтом, необходимого для получения летальной дозы препарата (LFP – lethal feeding period) в условиях безальтернативного кормления, при этом проводился учет смертности животных. Последующие тесты свертываемости крови (blood clotting response – BCR) и дальнейший мониторинг показали, что у грызунов, получивших дозу антикоагулянта, меняется этот показатель. Выживаемость в тесте LFP или снижение влияния на свертываемость крови в тестах BCR – первое доказательство наличия резистентности, а дальнейшее совершенствование стандартизированной методики BCR расширяет понимание возможного влияния мутаций на эффективность использования препаратов.

Известно, что резистентность у серых крыс и домовых мышей передается по наследству согласно законам Менделя. В 2004 году был выявлен и секвенирован ген, отвечающий за устойчивость к антикоагулянтам – VKORC1. С помощью разработанной новой методики тестирования на молекулярном уровне был выявлен ряд мутаций, влияющих на резистентность, в основном у серых крыс и домовых мышей в Европе, Великобритании и других странах. Для таких исследований нужны лишь небольшие образцы тканей недавно убитых животных, например кончик хвоста, и не требуются живые, отловленные в природе зверьки. Данная методика широко применяется для сбора данных о географическом распространении мутаций, а также о возможном влиянии на их появление используемых средств борьбы с грызунами. На сегодняшний день выявлено три мутации гена серых крыс VKORC1, существенно влияющих на резистентность к антикоагулянтам второго поколения – бромациалону и дифенакуму и в связи с этим на результаты применения препаратов в полевых условиях.

**Ключевые слова:** родентициды-антикоагулянты, резистентность, лабораторные испытания, определение длительности периода, ген VKORC1, тесты LFP, серая крыса, домовая мышь.

### Почему родентициды-антикоагулянты стали революционным средством, изменившим контроль численности вредителей.

Мы применяем родентициды-антикоагулянты уже около половины века. За это время не было разработано других столь же эффективных и безопасных средств, превосходящих действие антикоагулянтов в сфере контроля численности грызунов; маловероятно создание таких препа-

ратов и в ближайшем будущем [6]. Применение родентицидов-антикоагулянтов в 50-х годах прошлого столетия стало революцией в сфере контроля численности грызунов, в первую очередь, потому что они не вызывали реакции избегания приманки, обеспечивая практическую возможность полного контроля над популяцией вредителя, а, кроме того, благодаря наличию абсолютного антитота к этим препаратам – витами-

Таблица 1

## Антикоагулянты первого и второго поколения

Действующий компонент	Химическая группа
а. Антикоагулянты первого поколения	
Дикумарол	гидроксикумарин
Варфарин	гидроксикумарин
Кумахлор	гидроксикумарин
Кумафурил	гидроксикумарин
Куматетралил	гидроксикумарин
Пиндон	Индан-дион
Дифацинон	Индан-дион
Хлорофацинон	Индан-дион
б. Антикоагулянты второго поколения	
Дифенакум	гидроксикумарин
Бромадиолон	гидроксикумарин
Флокумафен	гидроксикумарин
Бродифакум	гидроксикумарин
Дифетиалон	группа веществ, обладающих схожим действием с гидроксикумарином*

\* дифетиалон имеет ту же структуру, что и бродифакум, за исключением атома кислорода в кольце гидроксикумарина, который заменен атомом серы

на К1. Изначально родентициды-антикоагулянты, которые называют антикоагулянтами первого поколения (Табл. 1), имели сходный принцип действия: они блокировали цикл витамина К и предотвращали активацию четырех зависящих от витамина К факторов свертывания крови (протромбин [или фактор II] и факторы VII, IX и X). После принятия летальной дозы антикоагулянтов, требуется некоторое время для снижения уровня активности всех четырех зависимых от витамин К факторов свертывания крови, и как следствие происходит нарушение коагуляции крови. Гибель зверьков после принятия летальной дозы антикоагулянта наступает не сразу, а примерно через три дня. Именно эта задержка мешает животному установить причинно-следственную связь между поглощением антикоагулянта и кровоизлиянием, приводящим к летальному исходу. Таким образом, у животных, которые получали сублетальную дозу антикоагулянта, не возникает реакции избегания приманки, несмотря на то что эта доза достаточна для возникновения негативного ощущения.

Четыре фактора коагуляции крови, зависимых от витамина К, являются белками. В результате подробных исследований протромбина стало известно, что неактивные белки-предшественники содержат аминокислоту глутамин, в результате карбоксилирования которой получаем гамма-

карбоксиглутаминовую кислоту для активирования фактора коагуляции крови. В данном процессе карбоксилирования используется редуцированная форма витамина К, гидрохинон, который окисляется до эпоксида витамина К. Витамин К является коферментом и для того, чтобы процесс карбоксилирования был возможен, витамин К в циклическом процессе должен быть вновь преобразован в гидрохинон. Данный цикл включает в себя энзимы редуктазы эпоксида витамина К и хинон-редуктазу, два энзима, разделенных мембраной, которые в основном расположены в эндоплазматической ткани печени и поджелудочной железы [19].

Антикоагулянты также способны занимать активные участки редуктазы эпоксида витамина К и хинон-редуктазы. Но так как витамин К редуцирован и быстро открепляется от активных участков энзимов, антикоагулянты остаются привязанными к энзимам в течение некоторого времени, замедляя тем самым период полувыведения. Итак, антикоагулянты блокируют цикл витамина К, предотвращая активацию факторов коагуляции крови, зависимых от витамина К [19].

## Резистентность к родентицидам-антикоагулянтам

Открытие резистентности к антикоагулянтам у серых крыс в 1958 году и домовых мышей в начале 1960-х годов поставило под сомнение основное достижение в сфере контроля численности грызунов после начала применения антикоагулянтов [1] и вызвало споры по поводу будущего самих родентицидов. Это привело к разработке более эффективных антикоагулянтов второго поколения (Табл. 1) со сходным действием и теми же положительными качествами (в частности, они также не вызывают реакции избегания приманки, а витамин К является абсолютным антидотом).

Когда резистентность была впервые выявлена, появились опасения по поводу способа контроля резистентных популяций и применения родентицидов-антикоагулянтов в долгосрочной перспективе. Были разработаны направления борьбы с резистентностью, важнейшей составляющей которых стала необходимость быстрого выявления особей, обладающих устойчивостью к антикоагулянтам. Первым признаком резистентности грызунов к антикоагулянтам стала невозможность уничтожения вредителей, несмотря на корректное выполнение инструкций по их применению. Вскоре были разработаны лабораторные тесты, ставшие основным методом подтверждения резистентности и определения степени ее проявления на фоне действия применяемых препаратов.

Первоначально резистентность часто описывали как специфическую к отдельным препаратам (например, резистентность к варфарину), но дальнейшие исследования показали, что резистентность не является специфичной к конкретным препаратам. Установлено наличие перекрестной резистентности к действующим веществам для отдельных резистентных популяций

Так, Дж.Гривс (J.Greaves), П.Куллен-Айрес (P.Cullen-Ayres) с соавт. выделили три резистентные линии серых крыс из Шотландии, Уэльса и Хэмпшира и показали у них более высокую степень резистентности к двум антикоагулянтам первого поколения и более низкую – к трем антикоагулянтам второго поколения. Было также показано, что две резистентные линии крыс, известные до разработки антикоагулянтов второго поколения, обладают резистентностью к бромидиолону и дифенакуму – антикоагулянтам второго поколения [5].

### Первые методологии измерения резистентности

Первые тесты на резистентность проводили на подопытных животных, содержащихся в клетках и получавших родентицид, как и в полевых условиях в течение определенного периода (обычно от 4 до 6 дней). Считалось, что выживаемость в таких тестах являлась доказательством резистентности у диких животных, несмотря на то что результаты были получены при условии регулярного кормления, что редко случается с серой крысой на воле.

Были разработаны тесты на резистентность, с использованием методологии, сходной с определением резистентности к пиретроидам у насекомых. Для каждого действующего вещества антикоагулянта был установлен критерий чувствительности при использовании восприимчивых (не подвергнутых ранее действию антикоагулянтов) грызунов. Ответная реакция животных, у которых подозревали наличие резистентности к определенному веществу, сопоставлялась с критерием чувствительности [7]. Таким образом, были разработаны тесты LFP (период экспозиции препарата до момента летального исхода) и BCR (уровень свертываемости крови).

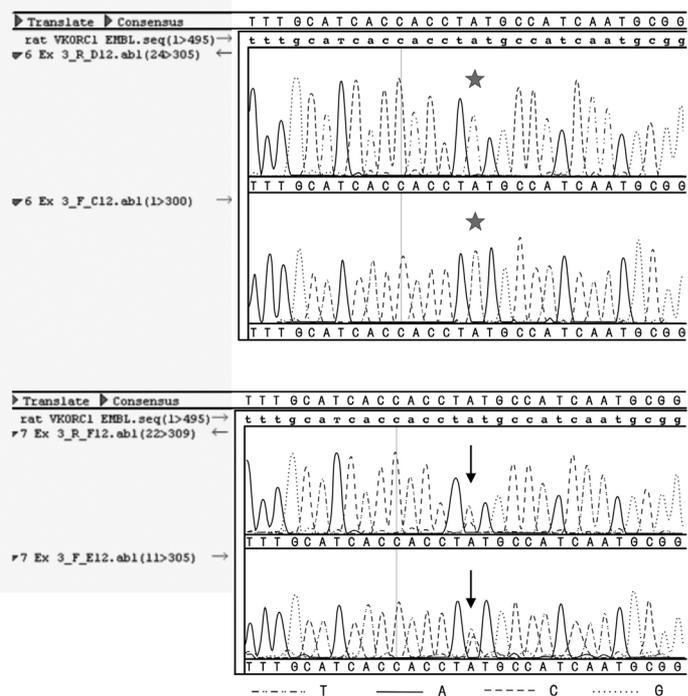
С помощью тестов LFP был установлен критерий чувствительности при кормлении групп грызунов антикоагулянтами-родентицидами в течение нескольких дней с последующим мониторингом гибели животных. Данные о смертности были проанализированы с помощью пробит-анализа для установления срока (в днях) получения животными родентицидов, необходимого

для достижения 99% гибели (LFP99). Этот период, округленный до целого количества дней, принимали за контрольный в дальнейших тестах на резистентность. При проведении контрольных тестов считается, что у выживших животных имеется резистентность. Практическое достоинство теста состоит в том, что он работает с параметрами, которые легко применимы к приманкам в полевых условиях. Уровень смертности – измеримая величина, и в тестах на резистентность к препаратам первого поколения, например варфарин, были использованы приманки, аналогичные тем, которые применялись в полевых условиях. Частично эта практическая компонента была уменьшена в тестах LFP при работе с препаратами второго поколения, потому что при установке контрольных доз было необходимо снизить концентрацию действующего вещества в приманках, иногда в 10 раз, чтобы получить удовлетворительные результаты пробит-анализа ответной реакции на полученные дозы [3]. Это привело к противоречивым результатам. Например, в случае с бродифакумом, крысы считаются резистентными, если они выживают после поедания 0.0005% приманок; тогда как на практике применяются только 0.005%-е приманки. Кроме того, в процессе проведения теста, животных регулярно кормили родентицидами в течение всего летального периода кормления, тогда как для диких особей это редкость. Таким образом, результаты нуждаются в субъективной оценке с целью разделения действительно резистентных особей и зверьков, которые получили мало препарата.

С помощью BCR-тестов, был установлен критерий чувствительности определением дозы антикоагулянта, которая вызывает пролонгацию коагуляции у 99% особей. Так же, как и тест LFP, данный тест предполагает циклы кормления групп чувствительных (не подвергнутых ранее действию антикоагулянтов) особей дозами препарата и составление кривой ответной реакции с помощью пробит-анализа результатов. Определяется доза, которая позволяет достичь увеличения времени коагуляции у 99% чувствительных особей (ED99); считается, что животные обладают резистентностью, если после получения дозы ED99 коагуляция не замедляется.

У тестов BCR есть несколько преимуществ по сравнению с тестами LFP [11]. Они более точные, их легче проводить, они не зависят от пищевого поведения животного, и тестируемые животные не погибают, поэтому их можно использовать для других исследований. Тесты основаны на том, что время коагуляции образцов крови резистентных животных не увеличивается до такой же степе-

## СРЕДСТВА И ТЕХНОЛОГИИ



**РИС. 1.** Секвенирование ДНК для анализа гена *VKORC1* двух серых крыс с обозначенной локацией 139 (звездой и стрелой показаны восприимчивое и гетерозиготное резистентное животные соответственно)

ни, как время коагуляции крови чувствительных животных после ввода определенной дозы антикоагулянта. Недостатком же теста является то, что изменение времени коагуляции (переменный показатель теста), не связано напрямую с результатами полевых исследований.

Европейская организация по защите растений имеет документацию тестов варфарина на серых крысах (контрольные тесты – 6 дней кормления 0.005%-м препаратом), дифенакума (контрольные тесты – 5 дней кормления 0.005%-м составом) и бродифакума (контрольные тесты – 6 дней кормления 0.005%-м составом); а также тестов BCR на серых крысах с варфарином, дифенакумом и бромдиолоном [7]. Также имеется информация о тесте LFP на домашних мышах с варфарином (21 день кормления 0.005%-м препаратом) [13], и тест BCR на серых крысах хлорофациноном и дифациноном [11].

### Стандартизированная методология тестов BCR

Применяемые дозы препаратов в исходных тестах BCR значительно варьировали и не отражали токсичность действующих веществ. Поэтому

университету Рединга было поручено провести пересмотр тестов BCR, проведенных Комитетом по резистентности родентицидов организации Crop Life International (Rodenticide Resistance Action Committee of Crop Life International). Тесты BCR на серых крысах с варфарином, дифенакумом, бромдиолоном и дифациноном проводились, начиная с 60-х годов прошлого столетия. Однако, в каждом новом тесте метод ведения протокола изменялся, и результаты, полученные в разных тестах, невозможно было сравнивать; также стало крайне затруднительно соотносить результаты с данными полевых наблюдений. Кроме того, некоторые аспекты теста нельзя было обосновать; в частности, метод определения времени коагуляции и статистическое определение контрольной дозы.

Это привело к разработке стандартизированной методологии для определения наличия и степени физиологической резистентности у популяций грызунов. При использовании стандартизированной методологии были выявлены данные о степени восприимчивости серой крысы к варфарину, дифацинону, хлорофацинону и куматетралилу, а также к бромдиолону, дифенакуму, дифетиалону и бродифакуму серых крыс и домашних мышей [17].

Методология является статистически надежной и основывается на ED50 (а не ED99), и проверена на серых крысах и домашних мышах. Кроме этого, используя данную методологию возможно установить степень резистентности как крыс, так и мышей широкому спектру действующих веществ (при помощи оценки фактора резистентности) и прогнозировать влияние резистентности на контроль грызунов в полевых условиях.

### Новая методология тестирования резистентности на молекулярном уровне

Известно, что физиологическая резистентность передается от родителей к детям по наследству, согласно законам Менделя. Генетические исследования подтвердили моногенное, доминантное, аутосомное наследование резистентности у серых крыс; ген резистентности находится в хромосоме 1 [4]. У домашних мышей ген резистентности расположен в хромосоме 7, которая является аналогичной хромосоме 1 у крыс [20].

В 2004 году, генетическая мутация привела к резистентности к варфарину, которая была выявлена и секвенирована [15]. При использовании новой передовой технологии секвенирования ДНК [9] были обнаружены мутации гена *VKORC1* у серых крыс и домашних мышей, которые связывают с резистентностью к антикоагулянтам.

Таблица 2

## Известные мутации гена VKORC1 у серых крыс и домовых мышей [9, 12, 16]

Локация мутации резистентности		Мутация резистентности	Сокращенные названия мутаций
Шотландия	Серая крыса	Лейцин128 Глутамин	Leu128Gln, L128Q
Ланкашир			
Йоркшир			
Уэльс	Серая крыса	Тирозин139 Серин	Tyr139Ser, Y139S
Хэмпшир	Серая крыса	Лейцин120 Глутамин	Leu120Gln, L120Q
Беркшир			
Глостершир	Серая крыса	Тирозин139 Цистеин	Tyr139Cys, Y139C
Норфолк			
Линкольншир			
Йоркшир			
Кент	Серая крыса	Тирозин139 Фенилаланин	Tyr139Phe, Y139F
Кембридж/Эссекс	Серая крыса	Фенилаланин63 Цистеин	Phe63Cys, F63C
Ноттингемшир	Серая крыса	Аргинин33 Пролин	Arg33Pro, R33P
Кембридж	Домовая мышь	Лейцин128 Серин	Leu128Ser, L128S
Рединг	Домовая мышь	Тирозин139 Цистеин	Tyr139Cys, Y139C

На нижеприведенном рисунке представлен результат такого анализа, где разным цветом показаны четыре нуклеотидных основания ДНК (А-аденин, G-гуанин, Т-тимин и С-цитозин). При трансляции генетического кода ДНК в белок, триплеты нуклеотидов являются кодом для аминокислотной последовательности.

На рисунке 1 представлена дублированная ДНК с результатом секвенирования двух животных, с выделением нуклеотидных оснований (локация 139) – отмечено звездой у одного животного и стрелкой у второго. У первого зверька нуклеотидное основание аденин (А), а у второго в этом месте двойной пик – аденин (А) и цитозин (С).

У первого животного, который является восприимчивым и не обладает геном устойчивости на локация 139), триплет нуклеотидов «ТАТ» является кодом для аминокислоты Тирозин. Второе животное имеет в этом месте два пика, и, следовательно, гетерозиготно, с триплетом нуклеотидных оснований «ТАТ» и «ТСТ», который кодирует аминокислоты Тирозин и Серин соответственно. Второе животное, следовательно, гетерозиготно по устойчивой мутации Tyrosine 139 Serine (или Y139S).

### Географическое распространение резистентных мутаций в Британии и других странах

Лаборатории Британии и других европейских стран секвенируют ген VKORC1 серых крыс и домовых мышей, чтобы понять географическое распространение различных генов резистентности.

На сегодняшний день у британских серых крыс выявлены семь мутаций гена VKORC1, для пяти из которых (локации 120, 128 и 139 ген VKORC1) установлено влияние на результат применения антикоагулянтов первого поколения (Табл. 2, Рис. 2).

В начале 1990-х резистентность серых крыс была обнаружена в Беркшире, где была четко продемонстрирована резистентность к антикоагулянту второго поколения, бромадиолону, что делало применение препаратов неэффективным [14]. Позднее было установлено, что крысы этой популяции были носителем гена VKORC1 резистентной мутации L120Q.

Первоначально считали, что данная проблема резистентности ограничена территорией Беркшира, но недавние исследования резистентности с использованием новой молекулярной методологии, включающие в себя комплексные полевые исследования, показали, что масштабы проблемы гораздо шире (Рис. 3).

Так как большинство исследованных образцов были гомозиготными по L120Q, исследования по выявлению резистентности при использовании неэффективных антикоагулянтов-родентицидов должны проводиться широкомасштабно. Вероятно, британские ограничения, указанные на этикетках, способствовали развитию данной проблемы, так как бромадиолон и дифенакум самые эффективные антикоагулянты, разрешено использовать внутри и за пределами построек на фермах; а применение бродифакума и флокумафена ограничивается использованием лишь внутри помещений и таким образом

## СРЕДСТВА И ТЕХНОЛОГИИ



**РИС. 2.** Известные на данный момент географические области распространения пяти мутаций гена VKORC1 у серых крыс, которые влияют на результат применения родентицидов-антикоагулянтов первого поколения

делает их недоступными для контроля численности большинства серых крыс.

Организация RRAG, которая включает представителей университетов, государственных организаций и всех секторов индустрии контроля численности вредителей, составила обзор результатов доступных лабораторных и полевых исследований, проведенных в Британии, Дании, Франции и Германии и подготовила инструкции по работе с различными мутациями, приводящими к резистентности к антикоагулянтам, которые зарегистрированы у серых крыс, обитающих в Британии [1].

В результате, в соответствии с рекомендациями RRAG, не стоит применять антикоагулянты первого поколения для борьбы с серыми крысами, которые обладают одной из пяти следующих мутаций VKORC1 – L120Q, L128Q, Y139C, Y139F и Y139S; также не стоит использовать антикоагулянты второго поколения – бромадиолон и дифенакум для

борьбы с популяциями серых крыс, которые обладают одной из трех следующих мутаций VKORC1 – L120Q, Y139C, и Y139F. Это объясняется тем, что географическое распространение этих трех мутаций очень обширно (Рис. 4, Табл. 3), и границы их распространения еще предстоит определить.

На данный момент в Британии проведены лишь незначительные исследования гена VKORC1 у домашних мышей, поэтому существует немного информации о распространении резистентных генов и их влиянии на применение препаратов, хотя есть доказательства, что мутация Y139C гена VKORC1 объясняет высокую степень резистентности к бромадиолону [10].

Организация RRAG недавно приняла решение начать сбор образцов кончиков хвостов домашних мышей из различных частей Британии, поэтому существует вероятность, что информация станет доступной в ближайшем будущем. Последние исследования, проведенные в Германии по изучению распространения и частоты мутаций гена VKORC1 у домашних мышей, помогли выделить три типа мутаций, вызывающих снижение эффективности применения антикоагулянтов первого поколения [8]. Две из них были такими же, как и мутации, обнаруженные в Британии, а именно Y139C и L128S мутации гена VKORC1. Третий тип мутации – комбинация четырех мутаций гена VKORC1: R12W, A26S, A48T и N61L.

Новая молекулярная методология предоставляет важный инструмент наблюдения за распространением резистентности к антикоагулянтам у серых крыс и домашних мышей. Такая методология эффективна для борьбы и с другими видами грызунов. В сочетании с полевыми наблюдениями и экспериментами, а также оценкой факторов резистентности при применении стандартизированных тестов BCR, сейчас появляется возможность прогнозировать вероятное воздействие мутаций гена VKORC1 на результаты контроля численности грызунов в полевых условиях. Кроме того, появилась возможность давать рекомендации в отношении антикоагулянтов: какие действующие вещества стоит использовать, а применение каких желательно избегать.

### Список использованной литературы (References)

**1. Buckle A.** 2013. Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest Management Science* 69, 334-341.

**2. Buckle A. P.,** 1994. Chapter 6. Control Methods: Chemical, in: Buckle A. P., Smith R. H. (Eds.), *Rodent*

Таблица 3

**Мутации VKORC1, которые влияют на контроль численности серых крыс в некоторых европейских странах[1]**

Страна	Резистентные мутации	Сокращенное название мутации
Бельгия	Лейцин120 Глутамин Тирозин139 Фенилаланин	Leu120Gln, L120Q Tyr139Phe, Y139F
Дания	Тирозин139 Цистеин	Tyr139Cys, Y139C
Франция	Лейцин120 Глутамин Лейцин128 Глутамин Тирозин139 Цистеин Тирозин139Фенилаланин	Leu120Gln, L120Q Leu128Gln, L128Q Tyr139Cys, Y139C Tyr139Phe, Y139F
Венгрия	Тирозин139Цистеин	Tyr139Cys, Y139C
Германия	Тирозин139Цистеин	Tyr139Cys, Y139C
Британия	Лейцин120 Глутамин Лейцин128 Глутамин Тирозин139 Цистеин Тирозин139 Фенилаланин Тирозин139 Серин	Leu120Gln, L120Q Leu128Gln, L128Q Tyr139Cys, Y139C Tyr139Phe, Y139F Tyr139Ser, Y139S
Корея	Тирозин139 Фенилаланин	Tyr139Phe, Y139F

Pests and their Control, 1st ed. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 127-160.

**3. Gill J. E., Macnicoll A. D.** 1991. Determination of the susceptibility of wild populations of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) to the anticoagulant rodenticide brodifacoum. *Z Angew Zool* 78, 101-118.

**4. Greaves J. H., Ayres P.** 1967. Heritable Resistance to Warfarin in Rats. *Nature* 215, 877.

**5. Greaves J. H., Cullen-Ayres P. B.** 1988. Genetics of difenacoum resistance in the rat, in: Suttie J. W. (Ed.), *Current Advances in Vitamin K Research*. Elsevier, Amsterdam, pp. 389-397.

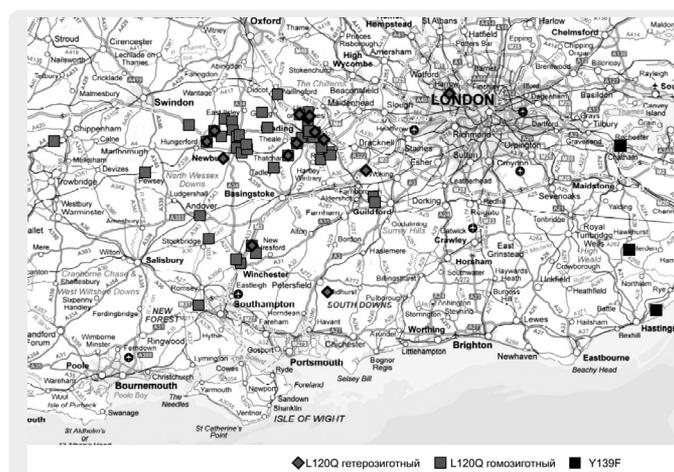
**6. Hadler M. R., Buckle A. P.** 1992. Forty five years of anticoagulant rodenticides – past, present and future trends, Fifteenth Vertebrate Pest Conference, University of Nebraska, Lincoln, USA, pp. 149-155.

**7. OEPP/EPPO, 1999.** Testing rodents or resistance to anticoagulant rodenticides, in: OEPP/EPPO (Ed.). OEPP/EPPO, Paris, France, pp. 131-137.

**8. Pelz H. J., Rost S., Müller E., Esther A., Ulrich R. G., Müller C. R.** 2012. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Management Science* 68, 254-259.

**9. Pelz H. J., Rost S., Hunerberg M., Fregin A., Heiberg A., Baert K., MacNicoll A., Prescott C. V., Walker A., Oldenburg J., Muller C. R.** 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170, 1839-1847.

**10. Prescott C. V.** 1996. Preliminary study of the genetics of resistance in the House mouse, in: Timm R. M., C. C. A. (Eds.), 17th Vertebrate Pest Conference. University of California, Davis, Rohnert Park, California, pp. 83-87.

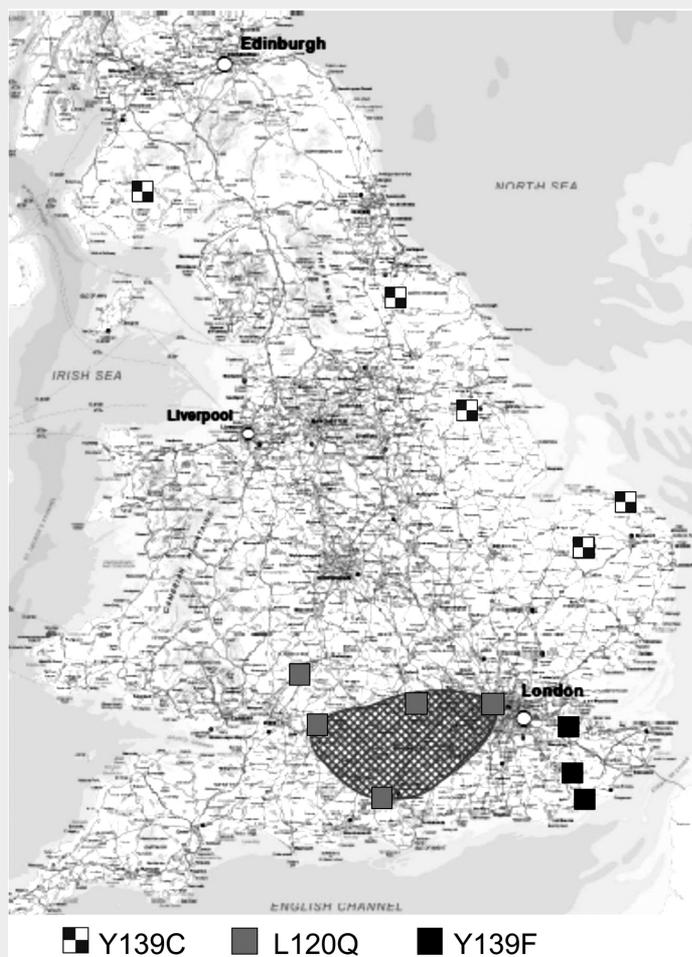


**РИС. 3.** Распространение мутаций гена VKORC1 у серых крыс L120Q (красный) и Y139F (голубой) на юге Англии

**11. Prescott C. V., Buckle A. P.** 2000. Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorophacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berk.). *Crop Protection* 19, 291-296.

**12. Prescott C. V., Buckle A. P., Gibbins J. G., Allan E.N.W., Stuart, A. M.** 2011. Anticoagulant resistance in Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.) in Kent – a VKORC1 single nucleotide polymorphism, tyrosine139phenylalanine, new to the UK. *International Journal of Pest Management* 57, 61-65.

**13. Prescott C. V., Buckle A. P., Hussain I., Endepols S.** 2007. A standardised BCR resistance test for all anticoagulant rodenticides. *International Journal of Pest Management* 53, 265 – 272.



**Рис. 4.** Распространение трех мутаций гена VKORC1 у серых крыс, которые могут повлиять на результат применения антикоагулянтов второго поколения: бромадиолона и дифенакума

**14. Quy R. J., Cowan D. P., Prescott C. V., Gill J. E., Kerins G. M., Dunsford G., Jones A., Macnicoll A. D.** 1995. Control of a Population of Norway Rats Resistant to Anticoagulant Rodenticides. *Pesticide Science* 45, 247-256.

**15. Ros S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hortnagel K., Pelz H. J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E.G.D., Muller C. R., Strom T. M., Oldenburg J.** 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance in multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537-541.

**16. Rost S., Pelz H. J., Menzel S., MacNicoll A. D., Leon V., Song K. J., Jakel T., Oldenburg J., Muller C. R.** 2009. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *Bmc Genetics* 10.

**17. Rowe F. P., Redfern R.** 1964. The toxicity of 0.025% warfarin to wild house mice (*Mus musculus* L.). *J. Hyg. Camb.* 62, 389-393.

**18. RRAC, 2003.** A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for a standardised BCR test methodology., in: International, C. (Ed.), *Technical Monograph* 2003, Belgium.

**19. Thijssen H.H.W.** 1995. Warfarin-Based Rodenticides: Mode of Action and Mechanism of Resistance. *Pesticide Science* 43, 73-78.

**20. Wallace M. E., MacSwiney F. J.** 1976. Major gene controlling warfarin-resistance in house mouse. *Journal of Hygiene* 76, 173-181.

### Resistance to the anticoagulant rodenticides – the deployment of the new molecular methodology to identify mutations of the VKORC1 'resistance gene', and understanding their potential impact on treatment outcome.

*C. V. Prescott.*

*Director of the Vertebrate Pests Unit and Principal Research Fellow, School of Biological Sciences, University of Reading, Whiteknights, Reading, Berkshire RG6 6AS, United Kingdom.  
e-mail: c.v.prescott@reading.ac.uk*

Anticoagulants rodenticides have already known for over half a century, as effective and safe method of rodent control. However, discovered in 1958 anticoagulant resistance has given us a very important problem for their future long-term use. Laboratory tests provide the main method for identification the different types of anticoagulant resistances, quantify the magnitude of their effect and help us to choose the best pest control strategy. The main important tests are lethal feeding period (LFP) and blood clotting response (BCR) tests. These tests can now be used to quantify the likely effect of the resistance on treatment outcome by providing an estimate of the 'resistance factor'. In 2004 the gene responsible for anticoagulant resistance (VKORC1) was identified and sequenced. As a result, a new molecular resistance testing methodology has been developed, and a number of resistance mutations, particularly in Norway rats and house mice. Three mutations of the VKORC1 gene in Norway rats have been identified to date that confer a degree of resistance to bromadiolone and difenacoum, sufficient to affect treatment outcome in the field.

Keywords: anticoagulants rodenticides, resistance, laboratory tests, resistance, lethal feeding period test, LFP, blood clotting response test, BCR, resistance factor, gene VKORC1, resistance mutations, Norway rat, House mouse.